

**METHOD FOR CARRYING OUT ENZYMATIC SYNTHESIS OF HYBRID SUGAR CHAIN**

**Patent number:** JP2002045196  
**Publication date:** 2002-02-12  
**Inventor:** FUJIYAMA KAZUHITO; SEKI TATSUJI; MISAKI AKIRA; IDO YOSHIHIRO  
**Applicant:** TOYO BOSEKI;; FUJIYAMA KAZUHITO  
**Classification:**  
- international: C12P19/26  
- european:  
**Application number:** JP20000234814 20000802  
**Priority number(s):** JP20000234814 20000802

Report a data error here

**Abstract of JP2002045196**

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To provide an enzymatic synthesis method capable of simply producing a complex saccharide having a hybrid sugar chain to resolve the difficulties on feeding the saccharide in large amounts, and widely utilizable for basic field and diagnose use of saccharide engineering. **SOLUTION:** This method for producing a complex saccharide having hybrid type saccharide chain is characterized by N-acetylglucosamylating and galactosylating a complex saccharide having saccharide chain, becoming a substrate of  $\beta$ -1-2 acetylglucosamine transferase I and not having N- acetylglucosamine or glucose at unreducing terminal in the presence of  $\beta$ -1-2 acetyl glucosamine transferase I and  $\beta$ -1-4 galactose transferase.

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

**BEST AVAILABLE COPY**

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2002-45196

(P2002-45196A)

(43)公開日 平成14年2月12日(2002.2.12)

(51)Int.Cl.<sup>7</sup>

識別記号

F I

データベース(参考)

C 1 2 P 19/26

C 1 2 P 19/26

4 B 0 6 4

審査請求 未請求 請求項の数9 OL (全 18 頁)

(21)出願番号 特願2000-234814(P2000-234814)

(22)出願日 平成12年8月2日(2000.8.2)

特許法第30条第1項適用申請有り 平成12年7月10日  
(社)日本生物工学会発行の「平成12年度(2000年)日本生物工学会大会講演要旨集」に発表

(71)出願人 000003160

東洋紡績株式会社

大阪府大阪市北区堂島浜2丁目2番8号

(71)出願人 598169697

藤山 和仁

大阪府吹田市山田西1-28 A18-308

(72)発明者 藤山 和仁

大阪府吹田市山田西1-28 A18-308

(72)発明者 関 達治

大阪府豊中市新千里西町2-1-1-1015

(74)代理人 100080791

弁理士 高島 一

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 混成型糖鎖の酵素的合成方法

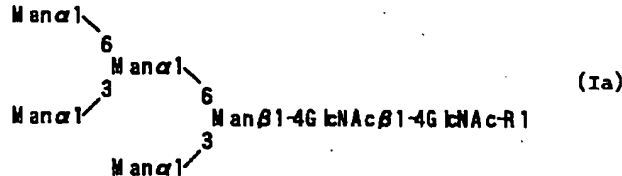
(57)【要約】

【解決手段】  $\beta$ 1-2 アセチルグルコサミン転移酵素Iの基質となり且つ非還元末端にN-アセチルグルコサミンあるいはグルコースを持たない糖鎖を有する複合糖質を、 $\beta$ 1-2 アセチルグルコサミン転移酵素Iおよび $\beta$ 1-4 ガラクトース転移酵素共存下にてN-アセチルグルコサミニル化およびガラクトシル化することを特徴とする、混成型糖鎖を持つ複合糖質の製造方法。

【効果】 本発明の製造方法により、従来、安定且つ大量の供給が困難とされていた混成型糖鎖を有する複合糖質を簡便に製造できる。当該混成型糖鎖は糖鎖工学の基礎分野や診断用途に広く利用することができる。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】  $\beta$ 1-2 アセチルグルコサミン転移酵素Iの基質となり且つ非還元末端にN-アセチルグルコサミンあるいはグルコースを持たない糖鎖を有する複合糖質を、 $\beta$ 1-2 アセチルグルコサミン転移酵素Iおよび $\beta$ 1-4ガラクトース転移酵素共存下にてN-アセチルグルコサミニル化およびガラクトシル化することを



(式中、R1は水酸基、2-アミノピリジル基、アスパラギンあるいはその類似体、またはポリペプチド鎖を示し、Manはマンノース残基を示し、GlcNAcはN

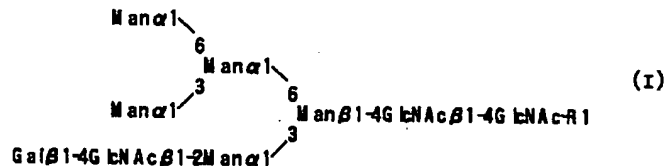
特徴とする、混成型糖鎖を持つ複合糖質の製造方法。

【請求項2】  $\beta$ 1-2 アセチルグルコサミン転移酵素Iの基質となり且つ非還元末端にN-アセチルグルコサミンあるいはグルコースを持たない糖鎖を有する複合糖質が、式(Ia)

【化1】

アセチルグルコサミン残基を示す)で表される化合物であり、混成型糖鎖を持つ複合糖質が、式(I)

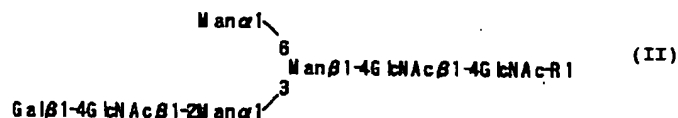
【化2】



(式中、R1は水酸基、2-アミノピリジル基、アスパラギンあるいはその類似体、またはポリペプチド鎖を示し、Manはマンノース残基を示し、GlcNAcはN-アセチルグルコサミン残基を示し、Galはガラクトース残基を示す)で表される化合物である、請求項1記載の製造方法。

【請求項3】  $\beta$ 1-2 アセチルグルコサミン転移酵素Iの基質となり且つ非還元末端にN-アセチルグルコサミンあるいはグルコースを持たない糖鎖を有する複合糖質が、式(IIa)

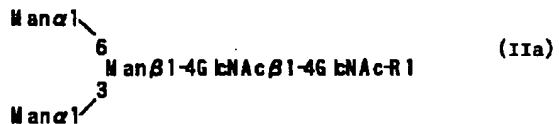
【化3】



(式中、R1は水酸基、2-アミノピリジル基、アスパラギンあるいはその類似体、またはポリペプチド鎖を示し、Manはマンノース残基を示し、GlcNAcはN-アセチルグルコサミン残基を示し、Galはガラクトース残基を示す)で表される化合物である、請求項1記載の製造方法。

【請求項4】 当該N-アセチルグルコサミニル化およびガラクトシル化が、UDP-N-アセチルグルコサミン、UDP-ガラクトース、緩衝液、および2価金属の共存下にて行なわれることを特徴とする請求項2または3記載の製造方法。

【請求項5】 当該緩衝液の濃度が、10~100mMである、請求項4記載の製造方法。



(式中、R1は水酸基、2-アミノピリジル基、アスパラギンあるいはその類似体、またはポリペプチド鎖を示し、Manはマンノース残基を示し、GlcNAcはN-アセチルグルコサミン残基を示す)で表される化合物であり、混成型糖鎖を持つ複合糖質が、式(II)

【化4】

【請求項6】 当該緩衝液のpHが5.0~8.5である、請求項4記載の製造方法。

【請求項7】 2価金属がマンガン塩である、請求項4記載の製造方法。

【請求項8】 マンガン塩の濃度が5~50mMである、請求項7記載の製造方法。

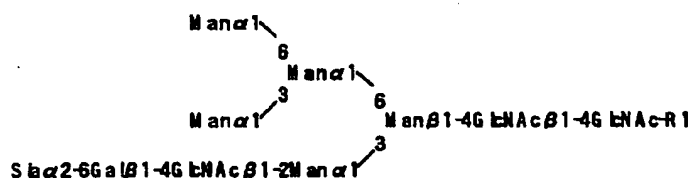
【請求項9】 マンガン塩が塩化マンガンである、請求項7または8記載の製造方法。

【発明の詳細な説明】

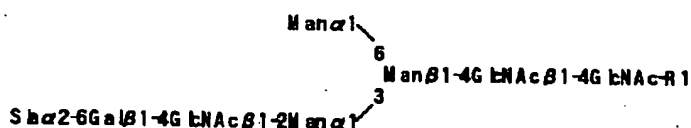
【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、診断用途あるいは糖鎖工学研究用途として有用な混成型糖鎖の酵素を用いた簡便な製造方法に関する。

【化7】



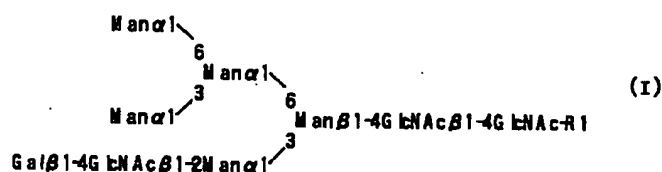
あるいは



【0009】(式中、各記号の定義は前述の通りである)で表される化合物およびそれらの前駆体である式(I)

【0010】

【化8】

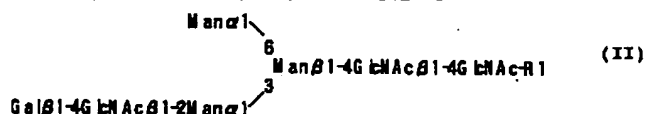


【0011】(式中、R1は水酸基、2-アミノピリジル基、アスパラギンあるいはその類似体、またはポリペプチド鎖を示し、その他の記号の定義は前述の通りである)

あるいは式(II)

【0012】

【化9】



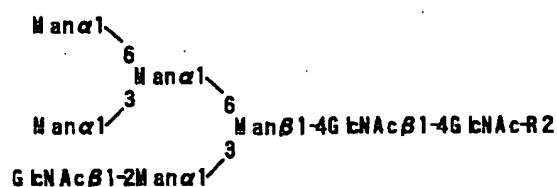
【0013】(式中、各記号の定義は前述の通りである)で表される混成型糖鎖を有する複合糖質が有用である。

が細胞毒性を発揮するには下記式

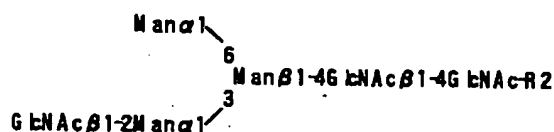
【0015】

【化10】

【0014】また、Clostridium botulinumのC2毒素



あるいは



【0016】(式中、各記号の定義は前述の通りである)に表される様な混成型糖鎖を有する構造が必要であることが知られている(M. Eckhardtら、J. Biol. Chem., 275, 2328, (2000))。このClostridium botulinumの感染予防あるいは治療、Clostridium botulinum毒素

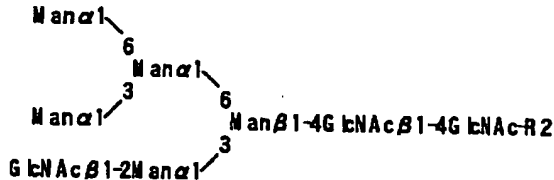
の検出にこれらの混成型糖鎖が有用と考えられている。

【0017】この様に、糖鎖工学研究用途あるいは種々の疾病の研究用途、医薬品・診断薬用途に混成型糖鎖の安定且つ大量な供給が重要になるが、これら糖鎖を天然から高純度で大量且つ安定に供給することは非常に困難

であった。また、化学的に合成することも煩雑且つ低収率であるため事実上困難であった。天然からの抽出あるいは化学合成の他に酵母に混成型糖鎖を持つ糖タンパク質を生産させる試みが為されている。すなわち、通常高マンノース型糖鎖しか作らない酵母細胞にマンノース分解酵素遺伝子と $\beta$ 1-2 N-アセチルグルコサミン転移酵素I 遺伝子を導入し、

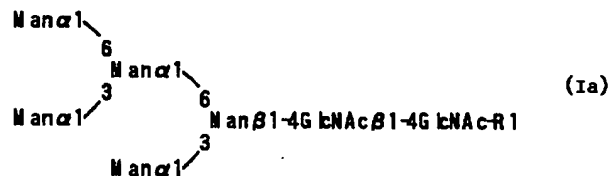
【0018】

【化11】

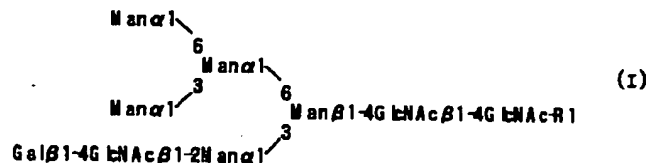


【0019】(式中、各記号の定義は前述の通りである)で表される混成型糖鎖を有する糖タンパク質を酵母に生産させることに成功している(地神芳文、第17回バイオテクノロジーシンポジウム予稿集、第24頁、1999年)。しかしながら、さらにガラクトースが付加された式(I)あるいは式(II)で表されるような構造の糖鎖は未だ得られていない。また、酵母の粗酵素液から糖鎖を抽出するため、目的の混成型糖鎖を得るためには煩雑な操作が必要であるといった問題点があった。

【0020】この様に、糖鎖工学研究用途あるいは種々の疾病の研究用途、医薬品・診断薬用途として重要な混成型糖鎖を安定且つ大量に供給することは事実上困難であった。



【0024】(式中、各記号の定義は前述の通りである)で表される化合物であり、混成型糖鎖を持つ複合糖質が、式(I)



【0026】(式中、各記号の定義は前述の通りである)で表される化合物である、上記(1)記載の製造方法。

(3) GnTIの基質となり且つ非還元末端にN-アセ

【0021】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、糖鎖工学や診断用途として有用な混成型糖鎖を安定且つ大量に供給することを目的とするものである。

【0022】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記課題に鑑み、鋭意検討を重ねた結果、 $\beta$ 1-2 N-アセチルグルコサミン転移酵素I (以下GnTIとも略する)の基質となり且つ非還元末端にN-アセチルグルコサミンあるいはグルコースを持たない糖鎖を有する複合糖質を、GnTIおよび $\beta$ 1-4 ガラクトース転移酵素(以下 $\beta$ 1-4GalTとも略する)共存下にてN-アセチルグルコサミニル化およびガラクトシル化することにより、混成型糖鎖を持つ複合糖質を酵素的に一段階で簡単に製造することに成功し、本発明を完成するに至った。すなわち、本発明は以下の通りである。

(1) GnTIの基質となり且つ非還元末端にN-アセチルグルコサミンあるいはグルコースを持たない糖鎖を有する複合糖質を、GnTIおよび $\beta$ 1-4GalT共存下にてN-アセチルグルコサミニル化およびガラクトシル化することを特徴とする、混成型糖鎖を持つ複合糖質の製造方法。

(2) GnTIの基質となり且つ非還元末端にN-アセチルグルコサミンあるいはグルコースを持たない糖鎖を有する複合糖質が、式(Ia)

【0023】

【化12】

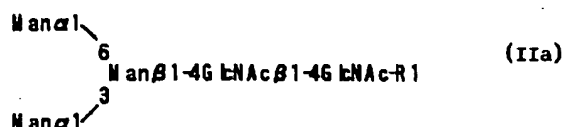
【0025】

【化13】

チルグルコサミンあるいはグルコースを持たない糖鎖を有する複合糖質が、式(IIa)

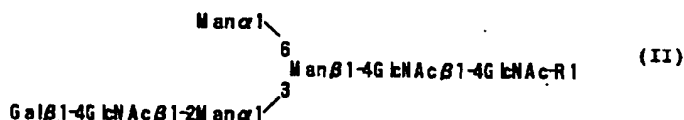
【0027】

【化14】



【0028】(式中、各記号の定義は前述の通りである)で表される化合物であり、混成型糖鎖を持つ複合糖質が、式(II)

【0029】  
【化15】



【0030】(式中、各記号の定義は前述の通りである)で表される化合物である、上記(1)記載の製造方法。

(4) 当該N-アセチルグルコサミニル化およびガラクトシル化が、UDP-N-アセチルグルコサミン(以下UDP-GlcNAcとも略する)、UDP-ガラクトース(以下UDP-Galとも略する)、緩衝液、および2価金属の共存下にて行なわれることを特徴とする上記(2)または(3)記載の製造方法。

(5) 当該緩衝液の濃度が、10~100mMである、上記(4)記載の製造方法。

(6) 当該緩衝液のpHが5.0~8.5である、上記(4)記載の製造方法。

(7) 2価金属がマンガン塩、就中塩化マンガンである、上記(4)記載の製造方法。

(8) マンガン塩の濃度が5~50mMである、上記(7)記載の製造方法。

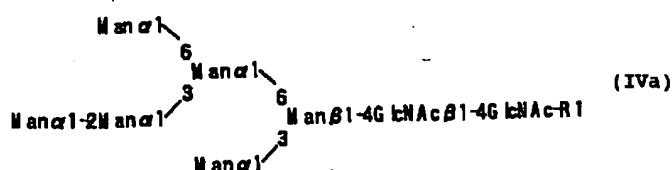
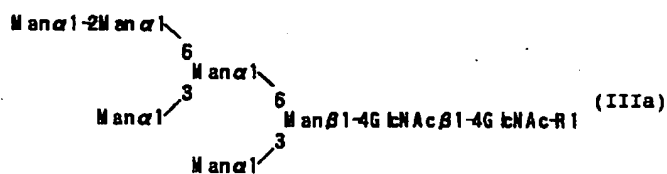
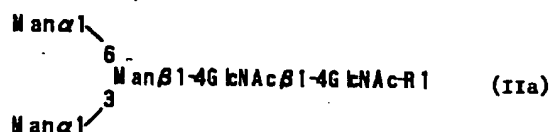
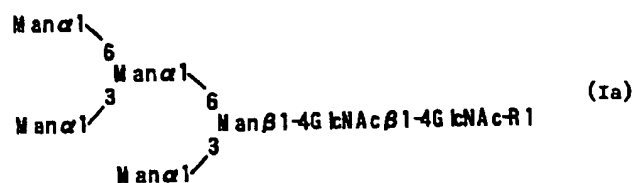
【0031】本発明の混成型糖鎖を持つ複合糖質の製造方法は、GnTIの基質となり且つ非還元末端にN-アセチルグルコサミンあるいはグルコースを持たない糖鎖を有する複合糖質を、GnTIおよび $\beta 1-4\text{GalT}$ 共存下にてN-アセチルグルコサミニル化およびガラクトシル化することを特徴とする。

【0032】本明細書における「複合糖質」なる用語は、当分野で通常用いられている「糖質と他の化合物の複合体」を意図するのに加え、より広義には糖質そのものならびにその修飾物をも包含する。当該他の化合物としては、アミノ酸、ペプチド、蛋白質、脂質あるいは他の天然または合成の高分子化合物(ウシ血清アルブミンに化学結合させた糖、ポリアクリルアミドに付加させた

糖等)、低分子化合物(4-アミノ安息香酸エチルエステル(ABEE)、4-アミノ安息香酸オクタンエチルエステル(ABOS)、2-アミノベンズアミド(2-AB)等)ならびにそれらの混合物等が挙げられる。本発明において好適に用いられるアミノ酸としては、アスパラギンおよびその類似体が挙げられる。本明細書において、「類似体」とは、アナログ体もしくは化学修飾されたもので、具体的には $\text{t-Boc}$ 基、 $\text{Fmoc}$ 基等の保護基で修飾されたもの等が挙げられる。糖質の修飾物としては、例えば2-アミノピリジル化等で標識化したもの等が挙げられる。より具体的には当該「複合糖質」としては、糖質、糖タンパク質、プロテオグリカン、糖脂質が例示される。

【0033】当該N-アセチルグルコサミニル化およびガラクトシル化を施す、出発材料としての複合糖質としては、GnTIの基質となり且つ非還元末端にN-アセチルグルコサミンあるいはグルコースを持たない糖鎖を有するものであれば特に限定されない。GnTIの基質となり得る必須の条件としては、(1)  $\text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}$ のマンノース部分がマンノースであるか、あるいは他の糖であってもその2位のOH基がマンノースと同じ立体構造であること、(2) 当該マンノース部分の4位がOH基であることが挙げられる。具体的には以下の式(Ia)、(IIa)、(IIIa)あるいは(IVa)で表される化合物ならびにそれらの誘導体が基質として用いられる。

【0034】  
【化16】



【0035】(式中、各記号の定義は前述の通りである)

【0036】ここで誘導体とは、当該N-アセチルグルコサミニル化およびガラクトシル化の妨げにならない程度に化学修飾が為されているものを意味し、例えば上記式中の糖鎖部分において1乃至数個の糖残基が付加乃至は除去されたものや、R1において種々の官能基が除去、付加あるいは置換されたもの等も包含される。例えばR1において2-アミノピリジル基が別の蛍光物質で置換されたものも、出発材料の複合糖質として使用可能である。

【0037】本発明において、β1-2 N-アセチル

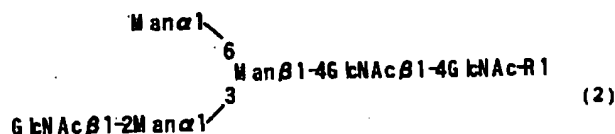
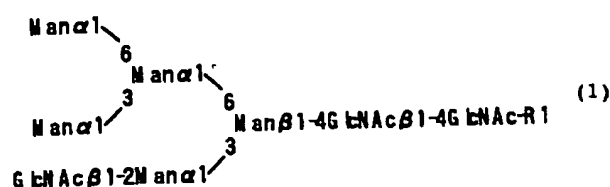
グルコサミン転移酵素I (GnTI) とは、例えば式(Ia)あるいは式(IIa)で表されるような構造の糖鎖のマンノースα1-3 (以下Manα1-3) 分岐のマンノースにのみβ1-2結合でN-アセチルグルコサミン (以下GlcNAc) を付加することができるものである。

【0038】また、本発明において、β1-4 ガラクトース転移酵素 (β1-4GalT) とは、例えば下記式(1)あるいは式(2)

【0039】

【化17】





【0040】(式中、各記号の定義は前述の通りである)で表されるような構造の糖鎖のGlcNAcに $\beta$ 1-4結合でガラクトースを付加することができるものをいう。上記式(1)あるいは式(2)で表される構造を有する複合糖質は、それぞれ式(Ia)あるいは式(IIa)で表される複合糖質のGnTI反応産物である。式(1)あるいは式(2)の $\beta$ 1-4GalT反応産物は、それぞれ式(I)あるいは式(II)で表される混成型糖鎖を有する複合糖質である。

【0041】本発明の製造方法で用いる糖転移酵素(GnTI、 $\beta$ 1-4GalT)は、天然由来のものでも、遺伝子組換えにより生産されたものでもよい。

【0042】天然由来の $\beta$ 1-4GalTとしては、牛乳、ヒト乳由来のものが商業的に入手可能である(シグマ社、ベーリンガーマンハイム社、オックスフォードグライコシステム社等)。組換え型 $\beta$ 1-4GalTとしては、牛乳由来の $\beta$ 1-4GalTを昆虫細胞で生産したものがカルビオケム社から、ヒト由来の $\beta$ 1-4GalTを大腸菌で生産したものが東洋紡社からそれぞれ市販されている。

【0043】天然由来のGnTIとしては、各種起源から公知の手法により採取、精製することによって得ることができる。例えばウサギ肝臓から精製した報告(Oppenheimer, C.L.ら、J. Biol. Chem., 256, 799 (1981); Y. Nishikawaら、J. Biol. Chem., 263, 8270 (1998))、ウシ初乳から精製した報告(Harpaz, N.ら、J. Biol. Chem., 255, 4885 (1980); Vella, G.ら、Can. J. Biochem. Cell Biol., 62, 409 (1984))、ブタ肝臓から精製した報告(Oppenheimer, C.L.ら、J. Biol. Chem., 256, 11477 (1981))等に基づいて調製することができる。また、ヒト由来ガン細胞(A431)等の細胞を起源として調製することも可能である。組換え型GnTIとしては、例えば、既知のGnTI遺伝子配列(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 9948 (1990) 参照)をもとにPCR反応により遺伝子を手し、大腸菌のマルトース結合タンパク質(MBP)遺伝子を持つベクターpMALc2にGnTI遺伝子を組み込み大腸菌にMBP-GnTI融合タンパク質として生産させることにより調製できる。当該ベクターならびに宿主となる大腸菌

等は商業的に入手可能である。好ましくは、入手が容易であるという点から、遺伝子組換えにより生産されたものを用いることが望ましい。

【0044】上記糖転移酵素は、固定化された糖転移酵素を使用しても問題はない。当該担体への酵素の固定化は、例えば糖転移酵素の別のタンパク質との融合タンパク質および当該タンパク質に特異的に結合するリガンドを有する担体を用いることによって好適に実施できる。該担体としては、マルトオリゴ糖、グルタチオン、ニッケル、キチン、セルロース等をリガンドとして側鎖に持つ担体が挙げられ、該リガンドは糖転移酵素に結合している別のタンパク質の種類によって適宜選択される。例えばマルトオリゴ糖を側鎖に持つ担体のマルトオリゴ糖部分をMBP- $\beta$ 1-4GalTやMBP-GnTIのMBP部分に特異的に結合させることによって固定化糖転移酵素を得ることができる。

【0045】使用する糖転移酵素の濃度は、基質の量、反応温度、pH等の反応条件によって適宜決定され得るが、数 $\mu$ l/ml～数ml/mlの範囲内で使用できる。1 $\mu$ l/ml程度の低濃度でも十分に目的を達成することができる。

【0046】本発明の製造方法は、好ましくは当該酵素反応に必須の上記二種の酵素に加え、当該反応を好適に実施するのに必要な糖供与体、適切な緩衝液、2価金属の共存下で実施する。

【0047】糖供与体としては、UDP-GlcNAcおよびUDP-Galが使用され、その濃度は、好ましくは基質糖鎖に対するKm値の1～5倍、より好ましくは該Km値の2～3倍、さらに好ましくはKm値の2倍程度であるが、さらに低濃度のものでも十分に目的を達成することができる。これらの糖供与体は商業的に入手可能である。

【0048】反応系に含まれる適切な緩衝液としては、GnTIおよび $\beta$ 1-4GalTが十分に機能しうる至適条件を達成し得るものであれば特に限定されないが、好ましくはpH5.0～8.5、より好ましくはpH6.0～7.5程度の緩衝液、就中HEPES緩衝液、MES緩衝液、Tris緩衝液等が用いられる。当該至適pH範囲をはざれると当然のことながら酵素反応は著しく低下する。当該

緩衝液の濃度も特に限定されないが、通常10～100mM程度であり、好ましくは10～20mM程度である。当該濃度が低すぎると十分な緩衝能が得られず、又、高すぎると酵素活性そのものを阻害する恐れがある。特に好ましい緩衝液としてはpH6.0～7.5、10～20mM程度のHEPES緩衝液である。当該緩衝液は自体公知の方法で調製することができる。

【0049】本発明において使用する2価金属としては、GnTIおよび $\beta$ 1-4GalTの両活性に必要とされるマンガン塩が望ましく、塩化マンガンを用いるのがより好ましい。当該マンガン塩の濃度は通常5～50mMであり、好ましくは10～20mMの範囲で使用する。

【0050】本発明において行なわれるN-アセチルグルコサミニル化およびガラクトシル化の反応は、上述のように例えば式(Ia)あるいは(IIa)のような構造の複合糖質を基質として、GnTIおよび $\beta$ 1-4GalT共存下、好ましくは糖供与体(UDP-GlcNAcおよびUDP-Gal)、適切な緩衝液、2価金属の共

存下で行なわれるが、当該反応は、通常両糖転移酵素の至適温度である30℃～37℃で、1～24時間、好ましくは10～16時間行なう。当該反応では、必要成分を一度に混合することができ、従って当該反応を一段階で完了させることができる。

【0051】本発明の製造方法によって得られた混成型糖鎖を有する複合糖質は、種々の糖転移酵素や糖鎖分解酵素等の酵素的手法、ヒドラジン分解等の化学的手法、加熱等の物理的手法等、公知の手法により糖鎖を切り出し、適宜所望の態様に改変することができる。

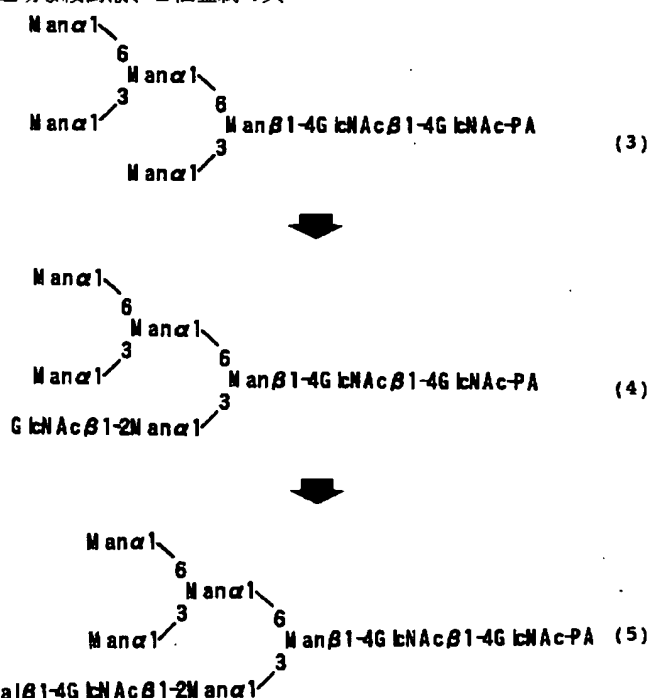
【0052】

【実施例】以下、本発明を実施例にて具体的且つ詳細に説明するが、本発明はこれらに何ら限定されるものではない。

【0053】実施例1：Man5混成型糖鎖の合成

【0054】

【化18】



【0055】(式中、PAは、2-アミノピリジル基を示し、その他の定義は前述の通りである)

式(3)で表される複合糖質を含む表1記載の組成の反応液500 $\mu$ lを37℃にて保温し、反応を行なった。尚、 $\beta$ 1-4GalTはシグマ社製品を、MBP-GnTIはGnTI遺伝子(既知のGnTI遺伝子配列をもとにPCR反応により調製; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 8

7, 9948 (1990)、参照)を含んだpMALc2ベクター(New England Bio Labs社製)により形質転換された大腸菌(E. coli BL21)を培養、誘導し、得られた粗酵素液をAmylose(New England Bio Labs社製)カラムクロマトグラフィーにより精製したものを使用した。

【0056】

【表1】

成分	最終濃度
HEPES/NaOH 緩衝液 pH 7.4	20.0 mM
MnCl <sub>2</sub>	12.5 mM
式 (3) 化合物	125.0 nM
UDP-GlcNAc	7.7 mM
UDP-Gal	0.4 mM
MBP-GnTI	1.3 μU/ml
ウシβ1-4GalT	1.3 μU/ml

【0057】反応開始後、0.5時間毎に反応液20μlをサンプリングし、表2記載の条件の高速液体クロマトグラフィー（以下、HPLCともいう）に供した。HPLCにより検出される各ピークの同定は各種ピリジルア

ミノ化糖鎖の標準品（図1）を用いて行なった。

【0058】

【表2】

カラム	PALPAK Type N (4.8 mm X 250 mm、宝酒造社製)
検出	蛍光（励起：320 nm、蛍光：400 nm）
溶媒A	200mM 酢酸-トリエタノール (pH7.3)/アセトニトリル=30/70 (v/v)
溶媒B	200mM 酢酸-トリエタノール (pH7.3)/アセトニトリル=50/50 (v/v)
グラジエント	0→60→100%溶媒B (0→20→25分)
流速	1.0 ml/分
カラム温度	40℃

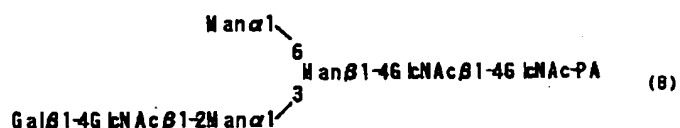
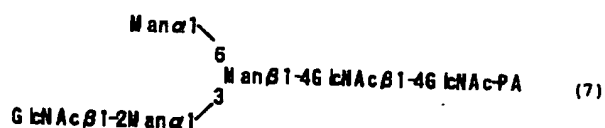
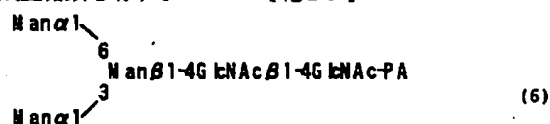
【0059】その結果、反応初期から中期にかけては式(3)で表される未反応基質、式(4)で表される反応中間体、式(5)で表される最終反応物が混在しているが（図2、図4参照）、反応時間10時間経過時では、式(5)で表される最終反応物、即ち混成型糖鎖を有する

複合糖質に100%変換されていることが確認された（図3、図4参照）。

【0060】実施例2：Man<sub>3</sub>混成型糖鎖の合成

【0061】

【化19】



【0062】（式中各記号の定義は前述の通りである）式(6)で表される複合糖質を含む表3記載の組成の反応液500μlを37℃にて保温し、反応を行なった。尚、実

施例1同様、β1-4GalTはシグマ社製品を、MBP-GnTIはGnTI遺伝子を含んだpMALc2ベクターにより形質転換された大腸菌を培養、誘導し、得

られた粗酵素液をAmyloseカラムクロマトグラフィーにより精製したものを使用した。

【0063】

【表3】

成分	最終濃度
HEPES/NaOH 緩衝液 pH 7.4	20.0 mM
MnCl <sub>2</sub>	12.5 mM
式(6)化合物	125.0 mM
UDP-GlcNAc	7.7 mM
UDP-Gal	0.4 mM
MBP-GnTI	1.3 μU/ml
ウシβ1-4GalT	1.3 μU/ml

【0064】反応開始から15時間、反応液20μlをサンプリングし、実施例1同様、表2記載の条件のHPLCに供した。HPLCにより検出される各ピークの同定は各種ビリジリアミノ化糖鎖の標準品(図5)を用いて行なった。

【0065】その結果、反応時間15時間経過時では、式(8)で表される最終反応物、即ち混成型糖鎖を有する複合糖質に100%変換されていることが確認された

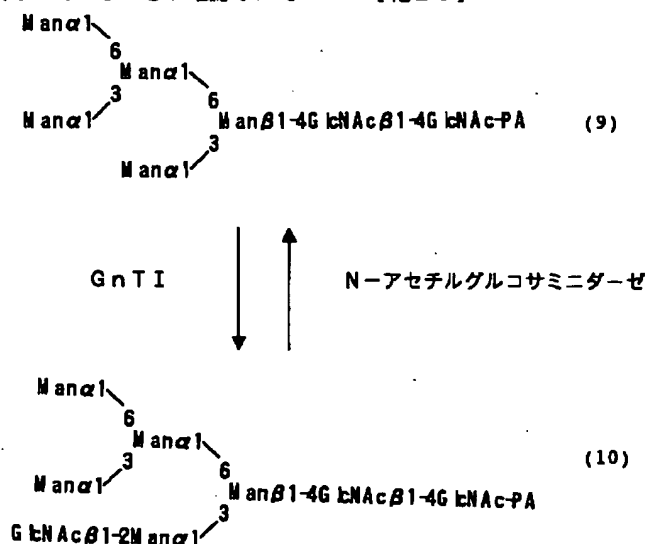
(図6参照)。

【0066】実施例3: RNase Bの糖鎖の混成型糖鎖への変換

高マンノース型糖鎖を持つRNase B(ブタ膵臓由来、シグマ社製)上の糖鎖を、本発明の製造方法を用いて、混成型糖鎖へと変換した。

【0067】

【化20】



【0068】(式中、各記号は前述の通りである) RNase Bからヒドラジン分解法により糖鎖を切り出し、常法に従いビリジリアミノ化を行なった。得られたビリジリアミノ化糖鎖を実施例1と同様にして、表2記載の条件のHPLCに供した。その結果、5本のピークが検出された(図7)。HPLCにより検出される各ピークの同定はマンノース標準品(図8)を用いて行なった。各マンノース標準品は、それぞれ宝酒造社製のビリジリアミノ化糖鎖を用いた。結果、一番目のピークはマンノース標準品のM5に位置することから、式(9)で

表される化合物と推測された。

【0069】次に基質としてRNase B、糖転移酵素としてMBP-GnTIのみを含む表4記載の反応液500μlを37℃にて保温して反応行なった。尚、実施例1同様、MBP-GnTIはGnTI遺伝子を含んだpMALc2ベクターにより形質転換された大腸菌を培養、誘導し、得られた粗酵素液をAmyloseカラムクロマトグラフィーにより精製したものを使用した。

【0070】

【表4】

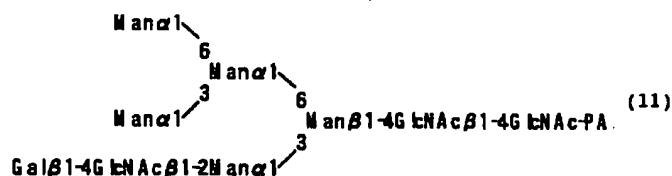
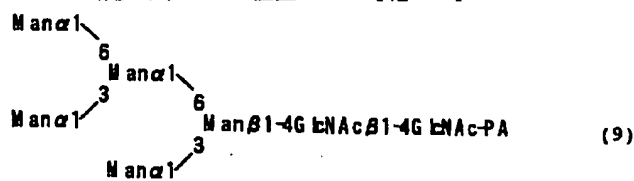
成分	最終濃度
RNaseB	2 mg/ml
UDP-GlcNAc	15 mM
MBP-GnTI	1 μU/ml
MES/NaOH 緩衝液 pH 6.1	100 mM
MnCl <sub>2</sub>	20 mM
NaCl	50 mM
2-メルカプトエタノール	1 mM

【0071】反応開始から15時間後、ヒドラジン分解法により糖鎖を切り出し、常法に従いピリジルアミノ化を行なった。得られたピリジルアミノ化糖鎖を実施例1と同様にして、表2記載の条件のHPLCに供した。その結果、M5の位置のピークが消失し、マンノース標準品M5に糖残基が1つ付加されたM6の位置にピークの増加が見られた(図9)。本ピリジルアミノ化糖鎖をN-アセチルグルコサミニダーゼ処理した後、HPLCに供した結果、M6の位置のピークが減少し、M5の位置

のピークが現れた(図10)。本結果から、式(9)で表される化合物がGnTIで処理することにより、N-アセチルグルコサミン残基が1つ付加された式(10)で表される化合物へと変換され、M6の位置でピークとなって検出されることが確認された。これらの結果からRNaseBがGnTIの基質となり得ることが確認された。

【0072】

【化21】



【0073】(式中、各記号の定義は前述の通りである)

次に、基質としてRNaseBを含む表5記載の組成の反応液500μlを37℃にて保温し、反応を行なった。尚、β1-4GalTは東洋紡社製品(組換え型ヒト由来)を、MBP-GnTIは実施例1同様、GnTI遺伝子を含んだpMALc2ベクターにより形質転換された大腸菌を培養、誘導し、得られた粗酵素液をAmyloseカラムクロマトグラフィーにより精製したものを使用した。

【0074】

【表5】

成分	最終濃度
RNaseB	2 mg/ml
UDP-GlcNAc	15 mM
MBP-GnTI	1 μU/ml
β1-4GalT	1 μU/ml
MES/NaOH 緩衝液 pH 6.1	100 mM
MnCl <sub>2</sub>	20 mM
NaCl	50 mM
2-メルカプトエタノール	1 mM

【0075】反応開始から15時間後、ヒドラジン分解

法により糖鎖を切り出し、常法に従いビリジルアミノ化を行なった。得られたビリジルアミノ化糖鎖を実施例1と同様にして、表2記載の条件のHPLCに供した。その結果、M5の位置のピークが消失し、マンノース標準品M5に糖残基が2つ付加されたM7の位置にピークの増加が見られた(図11)。ガラクトシダーゼ処理およびN-アセチルグルコサミニダーゼ処理を同時に行なった結果、M7のピークが消失し、M5のピークが現れた(図12)。本結果から、式(9)化合物がGnTIおよび $\beta$ 1-4GalTでの処理により、N-アセチルグルコサミン残基およびガラクトース残基がそれぞれ付加された式(11)化合物へと変換され、M7の位置でピークとなって検出されることが確認された。

【0076】さらに、確認の為、RNaseBの糖鎖を

カラム	コスモシルバックドカラム (8.0 mm X 250 mm、タテサテ社製)
検出	蛍光 (励起: 320 nm、蛍光: 400 nm)
溶媒A	0.02% トリフロロ酢酸 (和光純薬)
溶媒B	0.02% トリフロロ酢酸 (和光純薬) + 20% メタノール
グラジエント	0 → 0 → 30% 溶媒B (0 → 5 → 40分)
流速	1.2 ml/分
カラム温度	30℃

【0078】

【発明の効果】本発明の製造方法により、従来、安定且つ大量の供給が困難とされていた混成型糖鎖を有する複合糖質を簡便に製造できる。当該混成型糖鎖は糖鎖工学の基礎分野や診断用途に広く利用することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】実施例1で使用した、ビリジルアミノ化糖鎖標準品のHPLCチャート図である。

【図2】GnTIおよび $\beta$ 1-4GalTを用いたMan5混成型糖鎖の合成反応(実施例1)における、反応150分後の反応産物のHPLCチャート図である。

【図3】GnTIおよび $\beta$ 1-4GalTを用いたMan5混成型糖鎖の合成反応(実施例1)における、反応10時間後の反応産物のHPLCチャート図である。

【図4】GnTIおよび $\beta$ 1-4GalTを用いたMan5混成型糖鎖の合成反応(実施例1)における、反応時間と各種反応産物の割合の変化を示すグラフである。

【図5】実施例2で使用した、ビリジルアミノ化糖鎖標準品のHPLCチャート図である。

【図6】GnTIおよび $\beta$ 1-4GalTを用いたMan3混成型糖鎖の合成反応(実施例2)における、反応

GnTIおよび $\beta$ 1-4GalTで処理して得られる反応産物のHPLC画分であるM7ピークを分取し、表6記載の条件のHPLCに供した結果、別に調製した式

(11)化合物標準品(Palacpac, N. Q.,ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 4692 (1999))とピーク位置が一致したことからM7ピークは式(11)で表される化合物であることが明らかとなった。M7ピークのHPLC分析の結果を図13に、式(11)化合物標準品のHPLC分析の結果を図14に示す。以上の結果から、複合糖質を直接基質として本発明の製造方法により混成型糖鎖を持つ複合糖質へ変換可能であることが確認された。

【0077】

【表6】

15時間後の反応産物のHPLCチャート図である。

【図7】RNaseBの糖鎖のHPLCチャート図である。

【図8】実施例3で使用した、マンノース標準品のHPLCチャート図である。

【図9】GnTI反応後のRNaseBの糖鎖のHPLCチャート図である。

【図10】GnTI反応後のRNaseBの糖鎖をさらにN-アセチルグルコサミニダーゼ処理した後の該糖鎖のHPLCチャート図である。

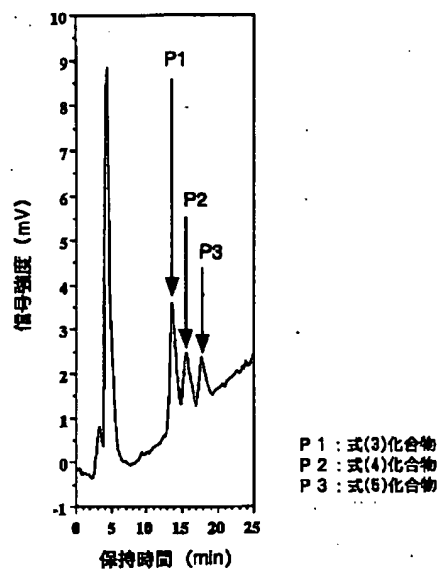
【図11】GnTIおよび $\beta$ 1-4GalT反応後のRNaseBの糖鎖のHPLCチャート図である。

【図12】GnTIおよび $\beta$ 1-4GalT反応後のRNaseBの糖鎖をさらにガラクトシダーゼ処理およびN-アセチルグルコサミニダーゼ処理した後の該糖鎖のHPLCチャート図である。

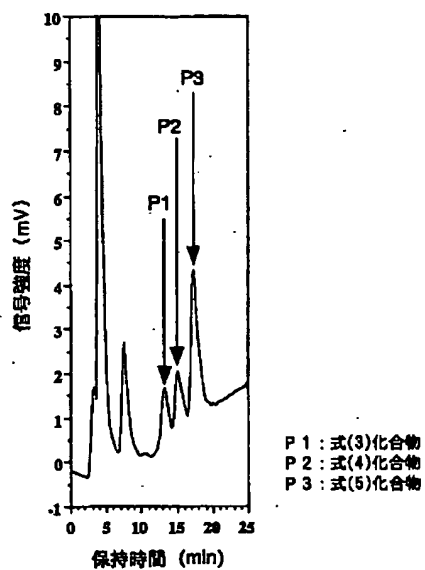
【図13】M7ピーク画分のHPLCチャート図である。

【図14】式(11)化合物の標準品のHPLCチャート図である。

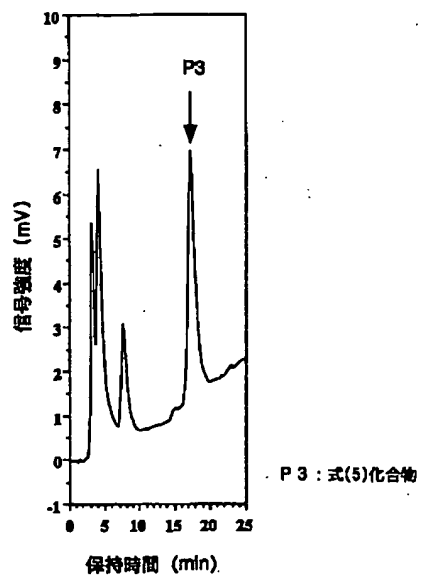
【図1】



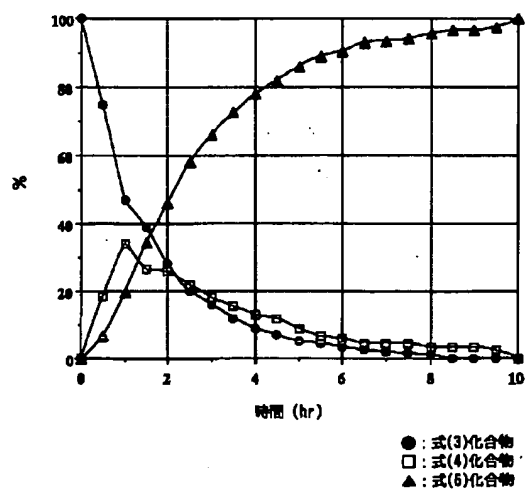
【図2】



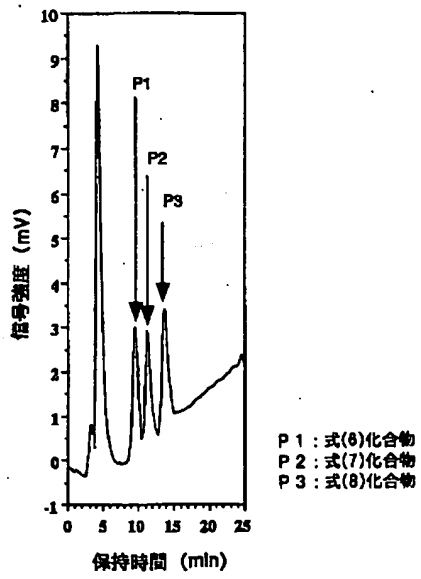
【図3】



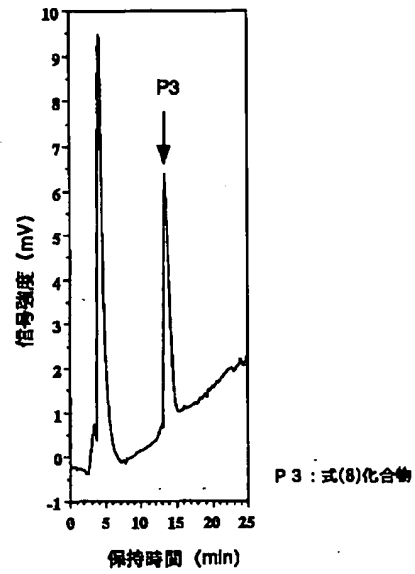
【図4】



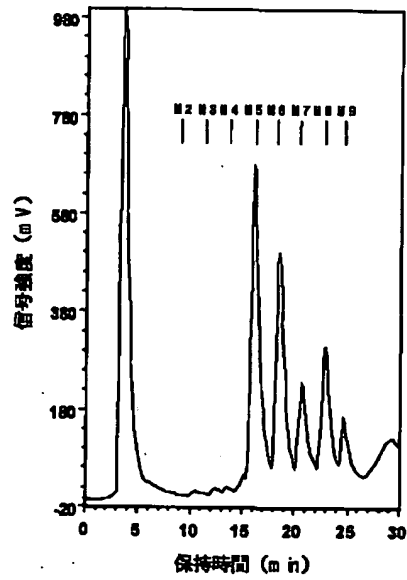
【図5】



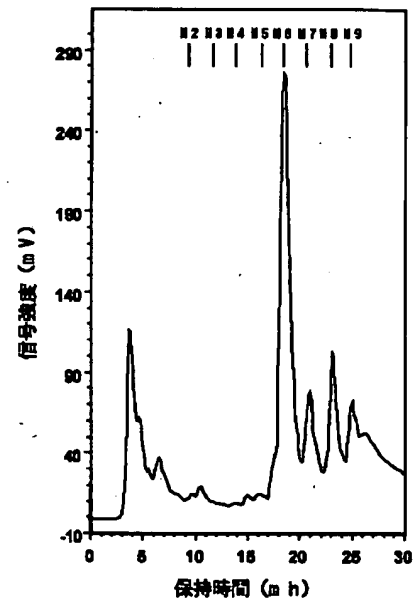
【図6】



【図7】



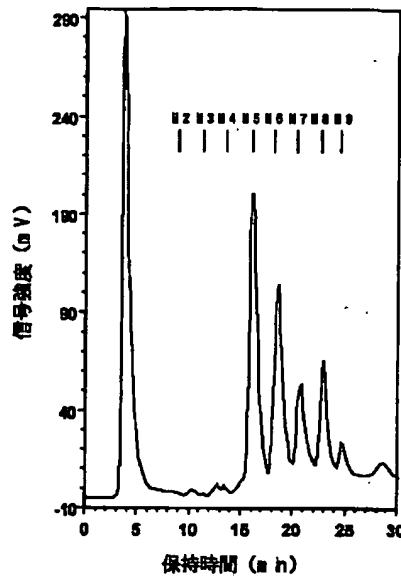
【図9】



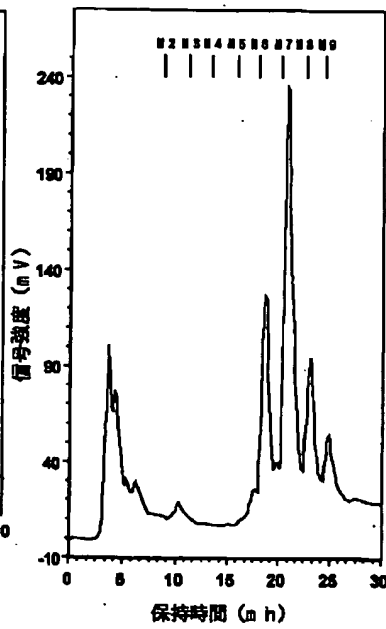




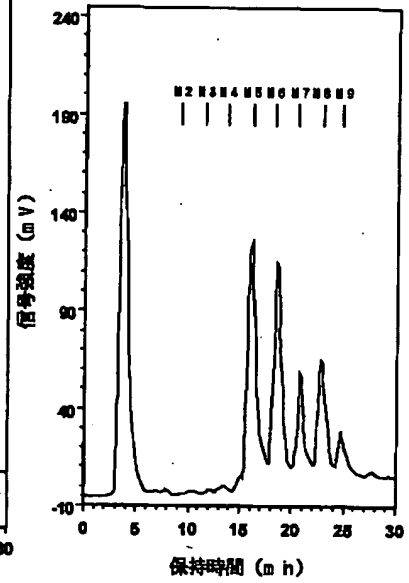
【図10】



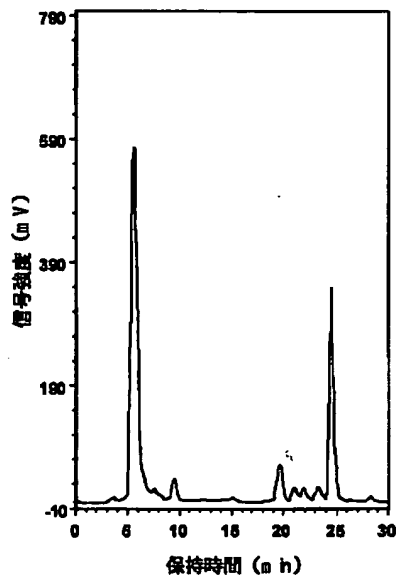
【図11】



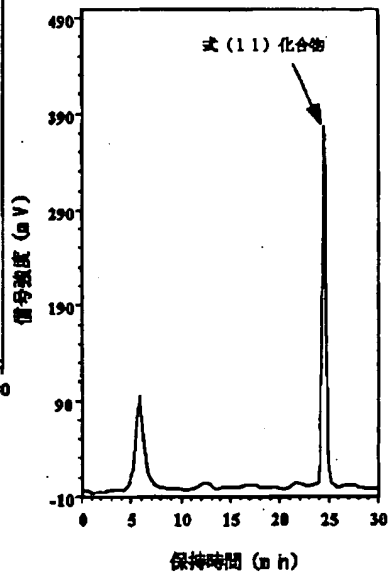
【図12】



【図13】



【図14】



フロントページの続き

(72)発明者 三崎 亮  
大阪府豊中市刀根山4-3-31-301

(72)発明者 井戸 芳博  
大阪府茨木市下穂積2-2-24 ヤングヴ  
ィレッジ茨木1110号  
Fターム(参考) 4B064 AF21 CA21 CC03 CC07 CC09  
CD02 CD12 CD15 DA13

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**